

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VARIANTES DEL VIRUS EPSTEIN-BARR DETECTADAS EN CAVIDAD ORAL DE ADOLESCENTES COLOMBIANOS.

Daniela Arturo Terranova

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia
Correo electrónico: daniela.arturo@correounivalle.edu.co

Andrés Orlando Castillo Giraldo

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia
Correo electrónico: andres.castillo.g@correounivalle.edu.co

RESUMEN

El virus de Epstein-Barr (VEB) es un virus ubicuo y oncogénico, asociado con el desarrollo de enfermedades como la mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y otras neoplasias. Actualmente, se reconocen dos subtipos: VEB-1 y VEB- 2, distinguidos según las diferencias genéticas de sus antígenos nucleares EBNA. Así mismo, debido al alto grado de heterogeneidad y variabilidad encontrado en la proteína LMP1 del virus, se han descrito variantes asociadas a patogenias o a regiones geográficas específicas. Con el objetivo de identificar y caracterizar molecularmente las variantes del VEB detectadas en la cavidad oral de 100 adolescentes de la ciudad de Cali, Colombia, se realizó la amplificación por PCR convencional del gen EBNA3C para tipificar el virus y la amplificación, , purificación y secuenciación del dominio C-Ter de la proteína LMP1 para identificar variantes; se realizó un análisis filogenético y de mutaciones de las secuencias obtenidas comparándolas con variantes patogénicas o geográficas reportadas en GenBank-NCBI. El subtipo viral predominante fue el VEB-1(78 %); además, un 72,6% de aislados agruparon con la variante patogénica Raji, derivada de linfocitos B de un paciente con Linfoma de Burkitt, 13,7% se relacionó con variante de origen geográfico Mediterráneo y otro 13,7% no agrupó con ninguna de las variantes de referencia. Esta es la primera vez que se identifican variantes de LMP1-VEB en Colombia, por lo que estudios adicionales serán necesarios para caracterizar la variante sin identificar, y reconocer si es patogénica o es un aislado geográfico propio, presente en Cali.

Palabras clave : Colombia, LMP1-VEB Virus Epstein-Barr, Variantes Filogenéticas

ABSTRACT

The Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous and oncogenic virus, associated with the development of diseases such as infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and other neoplasms. Currently, two subtypes are recognized: EBV-1 and EBV-2, distinguished according to the genetic differences of their EBNA nuclear antigens. Likewise, due to the high degree of heterogeneity and variability found in the LMP1 protein of the virus, variants associated with pathogenesis or specific geographic regions have been described. In order to identify and molecularly characterize EBV variants detected in the oral cavity of 100 adolescents in the city of Cali, Colombia, conventional PCR amplification of the EBNA3C gene was carried out to classify the virus and amplification, purification and sequencing. of the C-Ter domain of the LMP1 protein to identify variants; a phylogenetic and mutational analysis of the obtained sequences was carried out comparing them with pathogenic or geographic variants reported in GenBank-NCBI. The predominant viral subtype was EBV-1 (78%); In addition, 72.6% of isolates grouped with the pathogenic variant Raji, derived from B lymphocytes of a patient with Burkitt's lymphoma, 13.7% was related to variant of geographical origin Mediterranean and another 13.7% did not group with any of the reference variants. This is the first time that variants of LMP1-EBV have been identified in Colombia, so additional studies will be necessary to characterize the unidentified variant, and to recognize if it is pathogenic or is an own geographic isolate, present in Cali.

Key Words : Colombia, LMP1-VEB Epstein-Barr Virus, Phylogenetic Variants

INTRODUCCION

El Virus Epstein-Barr, descrito por primera vez en 1964 por M.A Epstein, Y.M Barr y B Achong (Epstein *et al.*,1964) pertenece a la familia Herperviridae, subfamilia Gammaherpesvirinae, género Lymphocryptovirus (Rickinson *et al.*, 2007). La vía de transmisión del VEB es principalmente a través de la saliva (Higgins *et al.*,2007), igualmente existe información limitada que señala que el virus podría transmitirse vía leche materna y secreciones genitales (Kapranos *et al.*,2003).

La partícula viral del VEB presenta una envoltura que contiene en su interior una nucleocápside conformada por un genoma ADN de doble cadena con un tamaño de 172Kpb rodeado por una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros (Grünewald *et al.*, 2003). Para el VEB, se han descrito dos subtipos virales, el VEB tipo 1 (VEB-1) y tipo 2 (VEB-2). Esta clasificación se ha basado por la presencia de polimorfismos en las proteínas virales nucleares EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C (Sample *et al.*,1990); sin embargo, debido a que estos polimorfismos no son suficientes para describir toda la variación natural del VEB, también se han descrito variantes basadas en polimorfismos encontrados en otros antígenos virales, como la proteína latente de membrana 1 (LMP1) (Chang *et al.*,2009).

Clínicamente, el VEB se caracteriza por infectar persistentemente al 90% de la población mundial (Chabay & preciado.,2016) y es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa (MI) en niños y adolescentes (Gallart- Catalá.,2006) y de la enfermedad linfoproliferativa pos-transplantes (Young *et al.*, 2003). Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer se encuentra clasificado como carcinógeno del grupo 1 (Niedobitek *et al.*,2008) asociado con tumores como el linfoma de Burkitt (LB) (Brady *et al.*, 2008) y el carcinoma nasofaríngeo (CNF) (Tsao *et al.*,2017). Aún no son completamente entendidos los mecanismos etiológicos del VEB para el desarrollo de neoplasias malignas, sin embargo, estudios han propuesto que ciertas proteínas virales como la proteína LMP1, estarían implicadas en estas patologías (Lorenzetti *et al.*,2012).

La proteína LMP1, codificada por el gen viral *BNLF1*, tiene un peso molecular de 66 KDa y en el proceso de

penetración del virus se ancla a la membrana de las células infectadas desempeñando un papel importante en el desarrollo de las neoplasias (Gantuz., 2016). Esta oncoproteína viral tiene la capacidad de autorregularse a través del uso de vías celulares (Pratt *et al.*,2012): a bajas concentraciones se activa la vía de respuesta a proteínas desplegadas (UPR, unfolded protein response) y a través del factor de transcripción ATF4 (activation transcription factor 4) se promueve la transcripción de LMP1. A elevadas concentraciones celulares de LMP1 producen citostasis y autofagia; la sobreexpresión de LMP1 puede ser deletérea para la célula (Lee & Sugden., 2008). Además, posee la capacidad de transformar fibroblastos de roedores *in vitro* (Tsao *et al.*, 2002) y convertirlos en tumorigénicos *in vivo* (Dawson *et al.*,2012) y puede actuar como el receptor celular CD40 constitutivamente activado (Rickinson *et al.*,2007) perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Kieser & Sterz, 2015) que estimula de manera independiente de ligando, múltiples vías de señalización, promoviendo el crecimiento, proliferación celular, supervivencia e inhibición de la apoptosis (Vaysberg *et al.*,2008).

LMP1 consta de 386 aminoácidos sectorizados en tres dominios: un dominio N-terminal corto (N-Ter) del aminoácido 1 al 23; seis segmentos hidrofóbicos transmembrana (TM) del aminoácido 24 al 186; y finalmente, un dominio carboxilo terminal (C-ter) del aminoácido 187 al 386 (Izumi *et al.*,1997) . El dominio C-ter interactúa con proteínas celulares a través de regiones de activación denominadas CTAR1 y CTAR2, las cuales activan varias vías de señalización celular de la célula infectada (Young & Rickinson.,2004) .

Dado que las secuencias de ácidos nucleicos del gen *BNLF1* que codifican la región del dominio C-ter de la proteína LMP1, presentan una alta variabilidad entre los aislados identificados para el VEB, se ha propuesto esta región para separar subtipos o variantes moleculares del virus según su origen geográfico y asociación patológica (Tzellos *et al.*,2012; Edwards *et al.*,1999). La anterior información puede ayudar a diseñar los programas de prevención y tratamiento de enfermedades asociadas al VEB al conocer a que variantes del virus la población está expuesta.

Entre las variantes descritas según su origen geográfico se han identificado: Med+ y Med- de la región del mediterráneo; China1 y 2 de la región de China; NC de la región de Carolina del Norte; y Alaskan de la región de Alaska. Con relación a las variantes identificadas en líneas celulares patogénicas se han identificado: Raji, AG876 y MUTU de pacientes africanos con LB (Hatfull *et al.*,1988; Dolan *et al.*,2006 ; Lei *et al.*,2013); las cepas GD1, GD2, Cao, Med81 y AKATA de pacientes con CNF o LB (Santpere *et al.*,2014) y B95.8 de un paciente con MI (Edwards *et al.*,1999). Estas variantes se pueden encontrar ampliamente distribuidas, aunque con diferentes frecuencias en distintas partes del mundo (Farrell *et al.*,2015); sin embargo, el uso de los diferentes esquemas de clasificación basados exclusivamente en el dominio C-ter (Edwards *et al.*,1999; Sandvej *et al.*,1997; Walling *et al.*, 1990) ha **MATERIALES Y METODOS**

Tipo de Muestra

El presente estudio analizó 100 muestras de ADN positivas para el VEB. Las muestras procedían de enjuagues bucales de la cavidad oral de jóvenes adolescentes recolectadas en el estudio: "Detección del virus Epstein-Barr en escolares adolescentes en la ciudad de Cali-Colombia" (Giraldo-Ocampo *et al.*,2019) con acta de aprobación del comité de ética humana de la Universidad del Valle # 008-017.

Determinación de los subtipos del VEB

Para determinar la presencia de los subtipos del VEB se amplificó el gen viral *EBNA3C* con la pareja de cebadores propuesta por Kingman *et al.*(1996) con los cuales el tamaño del amplicón producto de la reacción de la PCR varía según el subtipo. Para el subtipo VEB-1 se obtiene un tamaño de 153pb, y para el VEB-2, de 246bp, lo anterior debido a una delección de 93 pb que presenta el VEB-1 en este gen. Los cebadores utilizados en la reacción de amplificación fueron: EBNA3Cfwd 5'- AGA AGG GGA GCG TGT GTT GT-3' y EBNA3Crev 5'-GGC TCG TTT TTG ACG TCG GC-3'. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: una desnaturalización de 5 min a 95°C; 35 ciclos de amplificación correspondientes a 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C. Las concentraciones de los reactivos fueron: 10mM Tris-HCl pH 8,4/50mM KCl

impedido la comparación directa entre los estudios, por lo que a la fecha no se tiene un consenso general.

El reconocimiento de las variantes y su posible asociación con regiones geográficas o diferentes patologías podrían contribuir al entendimiento de la enfermedad en la población. Debido a que hasta la fecha en Colombia, los pocos estudios sobre el VEB se han centrado únicamente en determinar la seroprevalencia del virus y su relación con diversas enfermedades, existe muy poca información referente a las variantes del virus y el efecto de estas en las personas; por tal motivo, este trabajo tuvo como objetivo identificar y caracterizar molecularmente las variantes del virus de Epstein-Barr, detectado en la cavidad oral de adolescentes de la ciudad de Cali, Colombia.

de buffer; 2 mM MgCl₂; 0,3 μM de cada cebador; 0,3 μM de dNTPs y un 1U de Taq polimerasa. Como controles positivos se utilizaron muestras anteriormente determinadas para cada uno de los subtipos y una positiva para coinfección viral, como control negativo se realizó el mix de PCR sin adicionar ADN. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Amplificación y secuenciación del gen *BNLF1* del VEB

Se amplificó parte del fragmento de aproximadamente 1390 pb del gen que codifica para la proteína LMP1. Se realizó a través de una PCR convencional amplificando específicamente el extremo carboxilo terminal (C-ter) usando los cebadores propuestos por Zuo *et al.* (2015) : BNLf1fwd 5'-GTG CGC CTA GGT TTT GAG AG-3' y BNLf1rev 5'-TTC CTT CTC TAA CGC ACT TTC TC -3' que amplifican un fragmento de 576 pb.

Se utilizó un termociclador ESCO Swift Minipro. El programa para amplificar constó de un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C seguidos por un último paso de extensión de 10 minutos a 72°C. La reacción se realizó con un volumen final de 25μl en presencia de Buffer de amplificación (10mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM

KCl); 0,7 mM MgCl₂; 0,4μM de cada cebador; 0,3 μM de dNTPs; 1 U de la enzima Taq ADN polimerasa y 2μL de ADN. Los productos de la amplificación fueron purificados y secuenciados por el método Sanger en la empresa Macrogen, Corea.

Análisis Filogenético

Las secuencias obtenidas fueron inicialmente convertidas a formato FASTA; se realizó su curación por medio de alineamientos utilizando el método de Clustal W del programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2015). Posteriormente, se realizó el análisis filogenético de las secuencias, bajo el mejor modelo sugerido por la herramienta de análisis Models (ML) de Mega 7. Se elaboró un árbol filogenético para el fragmento Carboxilo Terminal (C-Ter); este se realizó con máxima verosimilitud (Maximum Likelihood-ML), parámetros de 100 corridas independientes y 1000 análisis de bootstrap independientes. Las secuencias se alinearon junto con 7 secuencias completas de líneas celulares VEB-LMP1 obtenidas de GenBank derivadas de diferentes patologías: MI, (B95.8_V01555.2); CNF, (GD1_AY961628.3); CNF, (GD2_HQ020558.1); LB, (Akata_KC207813.1); CNF, (Cao_X58140.1); LB, (Raji_KF717093.1); MI (M8_KF373730.1) y LB, (AG876_DQ279927.1) y de aislados relacionados con regiones geográficas específicas descritas previamente para la clasificación C-ter, concretamente China 1 (AY337723.1), China 2 (AY337724.1), Med + (AY337722.2), Med- (AY337721.2), NC (AY337726.2), Alaskan (AY337725.1).

Análisis de mutaciones

La determinación de los cambios de aminoácidos del dominio carboxilo terminal de la proteína LMP1, a partir de las mutaciones no sinónimas en el gen *BNLFI*, se realizó con el programa Blastn utilizando la opción “CDS feature” usando como referencia de comparación la secuencia del VEB con número de acceso al GenBank-NCBI: NC_007605.

Análisis de efectos de las mutaciones en la función de LMP1

Se predijo si una mutación en la secuencia de aminoácidos de la proteína afectaba su función,

mediante un análisis in-silico por homología de secuencias utilizando servidor web SIFT 5.2.2 (Sorting Intolerant From Tolerant) (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>). La secuencia de aminoácidos de la proteína LMP1 (P03230) fue sometida al programa calculando las probabilidades normalizadas para todas las sustituciones posibles en cada posición de la alineación.

Modelamiento con I-Mutant y el algoritmo FOLD X

El servidor web I-Mutant (versión 2.0) (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) es una herramienta basada en neural-network para analizar la estabilidad de las proteínas y sus alteraciones, tomando en cuenta las mutaciones que ocurren en un solo sitio. I-Mutant proporciona los valores de energía libre generados por la alteración usando el algoritmo informático FOLD-X que estima cuantitativamente las interacciones que facilitan la estabilidad de las proteínas. La herramienta FOLD-X proporciona la comparación entre el modelo de la proteína sin la mutación comparado con la mutación y evalúa el impacto que ejerce la mutación en los enlaces débiles de Van-der Waals que influyen, en gran medida, en la descomposición de energía. La secuencia de proteína en formato FASTA obtenida en UniProt (P03230) se utilizó como entrada para predecir el efecto mutacional sobre la estabilidad de la proteína LMP1. El análisis del efecto de las mutaciones se realizó bajo condiciones ideales, con pH = 7.0 y una temperatura de 25°C.

RESULTADOS

Determinación de los subtipos del VEB

La amplificación de EBNA3C permitió detectar los subtipos virales del VEB en el 84% de la población estudiada, el otro 16% de las muestras no fueron posibles de amplificar. Se encontró que 66 aislados de adolescentes colombianos (66%) resultaron infectados con el subtipo 1 de VEB (VEB-1), mientras que el subtipo 2 (VEB-2) se detectó en 16 aislados (16%). Se reportó una coinfección con ambos tipos virales en 2 muestras (Fig 1) (Tabla1).

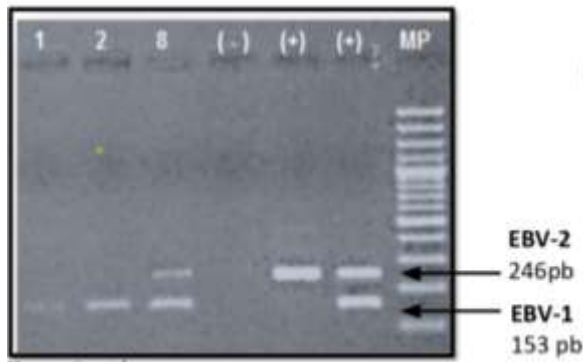


Figura 1. Subtipificación del VEB : Subtipo 1 (VEB-1) Fragmento de 153pb (carril 6) y Subtipo 2 (VEB-2) Fragmento de 246pb. Se detalla en el carril 7 una coexpresión de ambos subtipos. El carril 1 y 2 se amplifica una banda asociada a VEB-1 y en el carril 3 amplificó la muestra 8 correspondiente a una coexpresión de ambos subtipos. MP: Marcador de Peso molecular.

Determinación de las variantes de VEB

Para la determinación de las variantes del VEB, mediante la amplificación de un fragmento del gen *BNLF1* correspondiente a la región que codifica el dominio C-ter de la proteína viral LMP1, se obtuvieron 29 muestras positivas para la región C-Ter (Fig 2)

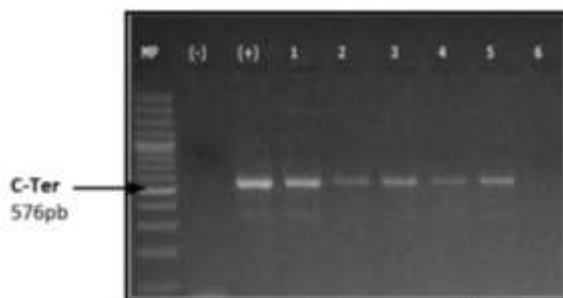


Figura 2. Fragmentos pertenecientes a la proteína LMP1 del VEB , Dominio C-Ter (576pb). Se detallan 9 carriles donde MP : Marcador de peso molecular. Una muestra negativa y una positiva. 5 muestras amplificables para el fragmento de 576pb y la muestra 6 que fue negativa para la amplificación

Análisis filogenético e identificación de variantes

Las variantes de LMP1 se caracterizaron mediante la reconstrucción filogenética con secuencias prototipo de GenBank. El modelo de evolución para la elaboración del análisis se determinó utilizando el programa MEGA 7, indicando que Jukes- Cantor (JC+G) era el más adecuado para el estudio; las tasas de sustitución encontradas para las secuencias fueron [AC]=[CG]= 0,166; [AG]=0,083; [AT]=0,083; [CT]=[GT]=0,166; las frecuencias de bases: A=0,250; C=0,250; G=0,250; T=0,250; p-inv= 0,5.

A partir de la reconstrucción filogenética de 29 aislados obtenidos de la región C-Ter de la proteína (Fig 3) se conformaron 6 grupos, dentro de los cuales el genotipo correspondiente al Mediterráneo se agrupó con 4 muestras de Cali (13,7%) teniendo un Bootstrap de 83%, seguido de un agrupamiento de 21 aislados de Cali (72,6%) relacionado con la línea celular Raji con un Bootstrap de 74% y finalmente, 4 muestras de Cali (13,7%) que no agruparon con ninguna de las líneas celulares ni con las regiones geográficas incluidos en el análisis, con un Bootstrap de 81%. A este ultimo se le decidió denominar clúster Cali, debido a región de aislamiento.

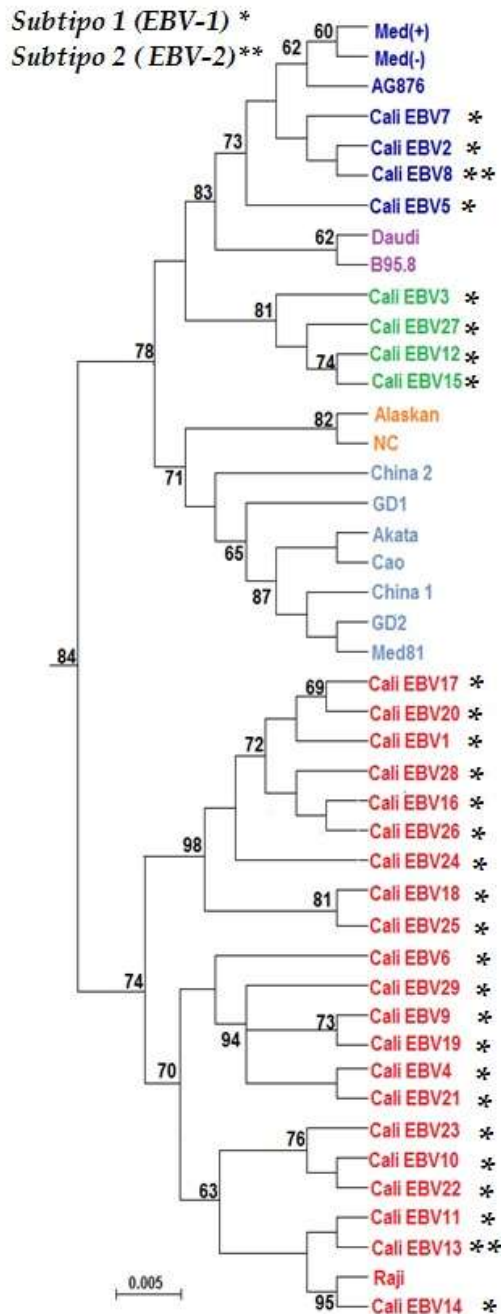


Figura 3. Análisis filogenético de la región C-Ter.

Se incluyeron aislados de regiones geográficas y líneas celulares. En color se identifican los grupos obtenidos: Mediterráneo (azul), Raji (rojo), Cali (verde), Alaska y Carolina del Norte (Amarillo), Daudi y B95.8 (morado). Los valores de Bootstrap se obtuvieron luego de 1000 réplicas, se muestran únicamente los >60%. La escala indica el número de sustituciones por sitio

Análisis de mutaciones



Figura 4. Frecuencia de mutaciones de VEB en aislados de Adolescentes Colombianos

Al analizar las mutaciones encontradas en los aislados de Cali con respecto al genoma de referencia de VEB (Fig 4), se encontraron en total 10 mutaciones no sinónimas; la más frecuente fue Gly212Ser, encontrándose en un 86,20% de los aislados; seguida de His213Asn con un 58% y Leu226His con un 27% (Tabla 1).

Así mismo, se relacionaron los cambios encontrados según las variantes de VEB (Fig 5) encontrando que aquellos relacionadas con Raji son las que presentan mayor cantidad de mutaciones, seguido de mediterráneo y la agrupación de Cali. Además, se observó que las mutaciones Ala210Asp (13%), Leu226His (27%) eran exclusivos para los aislados relacionados con Raji. No se encontró ningún cambio exclusivo para los aislados relacionados con el Mediterráneo o con el Clúster de Cali.

en conjunto, un aumento en la estabilidad de la proteína (tabla 3).

Así mismo, se relacionaron los cambios encontrados según las variantes de VEB (Fig 5) encontrando que aquellos relacionadas con Raji son las que presentan mayor cantidad de mutaciones, seguido de mediterráneo y la agrupación de Cali. Además, se observó que las mutaciones Ala210Asp (13%), Leu226His (27%) eran exclusivos para los aislados relacionados con Raji. No se encontró ningún cambio exclusivo para los aislados relacionados con el Mediterráneo o con el Clúster de Cali.

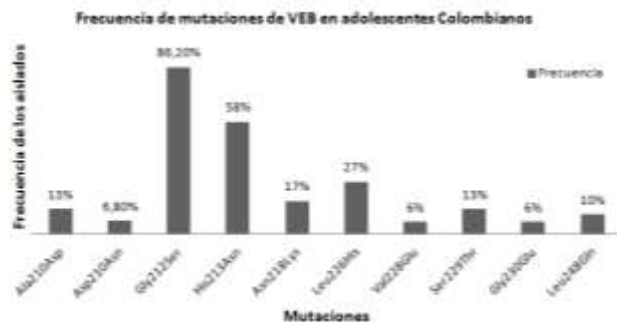


Figura 5. Presencia de mutaciones según variantes de VEB en aislados de Adolescentes Colombianos

Análisis con el servidor SIFT y Modelamiento con I-Mutant

Los resultados de la predicción del servidor SIFT para la secuencia de aminoácidos de la proteína LMP1 con presencia de mutaciones se presentan en la tabla 2. Todas las mutaciones proteicas presentaron índices de tolerancia bajos (< 0.05). El análisis de estabilidad de LMP1 por I-Mutant mostró que esta disminuye en el 50% de las mutaciones; sin embargo, para el caso de las mutaciones encontradas únicamente en la variante patológica Raji (Ala210Asp y Leu226His) se reportó

Tabla 1. Relación de los aislados de adolescentes Colombianos usados para identificar variantes.

<i>Aislado Cali VEB</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Variante C-ter</i>	<i>Identidad</i>	<i>Código de Acceso</i>	<i>Mutaciones</i>
1	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	A210N, G212S, H213N
2	VEB-1	Mediterráneo	98%	AY337722.2	G212S, H213N
3	VEB-1	Colombia	—	—	G212S, N218K, G230E
4	VEB-1	Raji	98%	KF717093. 1	G212S, H213N
5	VEB-1	Mediterráneo	97%	AY337722.2	D210AN, G212S,V228E
6	VEB-1	Raji	98%	KF717093. 1	G212S, N218K, L226H
7	VEB-1	Mediterráneo	99%	AY337722.2	G212S, H213N, S229T
8	VEB-2	Mediterráneo	98%	AY337722.2	G212S, S229T
9	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S, H213N, L226H
10	VEB-1	Raji	97%	KF717093. 1	N218K, L226H, V228E
11	VEB-1	Raji	98%	KF717093. 1	G212S, L226H
12	VEB-1	Colombia	—	—	D210N,G212S, L248Q
13	VEB-2	Raji	99%	KF717093. 1	L226H, G230E

14	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S, H213N, L226H
15	VEB-1	Colombia	—	—	G12S, S229T L248Q
16	VEB-1	Raji	96%	KF717093. 1	D210NA, G212S, H213N
17	VEB-1	Raji	98%	KF717093. 1	A210D, H213N
18	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S, L226H
19	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S, H213N
20	VEB-1	Raji	97%	KF717093. 1	G212S,L226H
21	VEB-1	Raji	97%	KF717093. 1	G212S,H213N
22	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S,H213N
23	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S,H213N, N218K
24	VEB-1	Raji	96%	KF717093. 1	G212S, H213N
25	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	A110D, G212S, H213N, G212S, H213N
26	VEB-1	Raji	97%	KF717093. 1	A210D, G212S, H213N
27	VEB-1	Colombia	—	—	G212S,S229T
28	VEB-1	Raji	98%	KF717093. 1	D210N, G212S,H213N
29	VEB-1	Raji	99%	KF717093. 1	G212S, H213N,

Tabla 2 . Índices de tolerancia de mutaciones para la proteína LMP1.

La fila corresponde a la posición en la proteína de referencia, la columna a uno de los 20 aminoácidos. Las sustituciones con índices bajos de tolerancia que se predicen perjudiciales para la función de la proteína <0.05 se resaltan en negrita. Las mutaciones encontradas en el estudio se anotan en negrita y subrayado .

Posición	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
210A	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
210D	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
212G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
213H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
218N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 3. Efecto de las mutaciones sobre la energía libre de la estructura de la proteína LMP1

Posición	Aminoácido	Mutación	Estabilidad	DDG(Kcal/mol)
210	A	D	Incrementa	-0.43
210	D	N	Disminuye	-1.12
212	G	S	Disminuye	-0.88
213	H	N	Incrementa	-1.25
218	N	L	Incrementa	0.39
226	L	H	Incrementa	-0.10
228	V	E	Disminuye	-1.02
229	S	T	Disminuye	-1.11
248	L	Q	Disminuye	-0.15
230	G	E	Incrementa	-0.23

DISCUSION

En el presente trabajo se definieron los subtipos virales del VEB encontrados con más frecuencia entre un grupo de adolescentes colombianos aparentemente sanos, se determinaron las variantes del virus a partir del análisis de la proteína viral oncogénica LMP1 y se analizaron las mutaciones encontradas en la región C-ter.

Determinación de los subtipos del VEB

La distribución observada en los subtipos virales mostró que VEB-1 es el tipo viral más frecuentemente detectado. Esto se asemeja a lo descrito en la literatura, donde se reporta VEB-1 predominando globalmente, mientras que VEB-2 es más frecuente en la región sub-Sahara del África (Rubsamen-Waigmann, *et al.*, 2003) . En la familia de genes EBNA3 se ha encontrado que el VEB-1 y VEB-2 difieren en un 10 al 20% de sus bases y la mayor diferencia fenotípica entre ambos

tipos, se basa en la aumentada capacidad del VEB-1 para inmortalizar las células B en la infección primaria en comparación con VEB-2 (Coleman *et al.*, 2017). La diferencia genómica global entre estos dos tipos no ha sido del todo establecida porque se han secuenciado pocos genomas completos de VEB-2 (Dolan *et al.* 2006; Palser *et al.*, 2015). Estudios realizados por Chang *et al.* (2009) donde combinaron estudios poblacionales de subtipos en la población caucásica, encontraron que el 74% está infectada con VEB-1, el 19% con VEB-2 y el 7% está coinfectado con ambos tipos virales. Así mismo, trabajos realizados en Argentina por Chabay *et al.* (2004) establecieron que el tipo predominante en el país era el VEB-1, apoyados por los estudios de Correa *et al.* (2004) en pacientes adultos sanos seropositivos de Argentina donde encontraron la presencia de VEB-1 en un 75,9% de la población, VEB-2 en un 17,6% y 6,5% de coinfección con ambos subtipos virales. Con respecto al bajo

porcentaje de coinfección encontrado en nuestro trabajo, esto podría estar relacionado con la exposición a infección, ya que probablemente los adolescentes evaluados, por los años de vida, aún no se han visto expuestos a sucesivas reinfecciones como si pudiera ocurrir en los adultos, por lo que podría aumentar la probabilidad de presentar una coinfección viral a medida que aumenta la edad, así como aumenta significativamente la viremia. Lo anterior se apoya con estudios realizados en China y Argentina, donde en China, Ai *et al.*(2012) evaluaron 107 pacientes pediátricos con MI y no encontraron ninguna coinfección con ambos tipos virales en los niños a pesar de padecer la enfermedad a temprana edad y en Argentina, Lorenzetti *et al.*(2012) evaluaron 35 pacientes pediátricos con MI y tampoco se detectó la coinfección por subtipos. Para Colombia, este es el primer reporte de subtipos de VEB en aislados de adolescentes aparentemente sanos.

Análisis filogenético e identificación de variantes

Los recientes estudios de VEB coinciden en que el gen *BNLF1* que codifica para LMP1 es uno de los más variables e informativos del virus, a diferencia del estudio de subtipos; esta variabilidad se distribuye a lo largo de toda la secuencia codificante e incluye mutaciones de nucleótidos únicos, deleciones, inserciones y variación en el número de repeticiones en tándem (Lei *et al.*,2013, Santpere *et al.*,2014 & Feederle *et al.*,2015). Muchos de los trabajos publicados alrededor del mundo sobre las variantes del virus, analizan la presencia de mutaciones únicamente en la región C-ter, ya que esta se vincula con la traducción de señales y por tanto con la actividad de la proteica. Según Chang *et al* (2009), la presencia de estas variaciones con potencial de alterar la señalización intracelular mediada por LMP1 serían el motivo por el cual este antígeno ha sido la proteína de VEB más estudiada en una amplia diversidad de patologías y regiones geográficas.

La reconstrucción filogenética de las variantes de LMP1 permitió observar que ninguno de los aislados de Cali se agruparon de manera cercana con la variante prototipo B95.8, que fue reportada en diferentes estudios por prevalecer en aislamientos Europeos (Chiara *et al.*,2016 & Smatti *et al.*,2017). Se observó que las variantes China 1, GD2, Cao y Akata, se encuentran estrechamente relacionadas al igual que

ambas variantes del mediterráneo. Mientras que las variantes China 2, NC y Alaskan conformaron grupos independientes entre sí, y a su vez independientes de las otras variantes. Estos resultados concuerdan con los resultados originalmente descritos por Edwards *et al.* (1999) y más recientemente por Saechan *et al.* (2010).

Estudios realizados en Argentina en una cohorte de pacientes con MI y linfomas VEB+ identificaron mediante la región C-Ter de la proteína, que la variante China 1 era la de mayor frecuencia en los dos grupos de pacientes, por tanto era la variante predominante en la región geográfica, sin relacionarse con alguna condición patológica en particular (Lorenzetti *et al.*, 2012); sin embargo, en el año 2017 al realizar la secuenciación del gen completo, el análisis filogenético permitió observar que aquellas variantes previamente clasificadas como China1, mostraron una relación más cercana con la variante de la línea celular Raji (Gantuz *et al.*, 2017); esta es la primera línea celular humana de origen hematopoyético obtenida en 1963 de un paciente nigeriano de 11 años con LB (Karpova *et al.*, 2004). La diferencia en el agrupamiento al utilizar la región C-ter y el gen completo, se fundamentó en el hecho de que la región secuenciada es más extensa y brindó más información filogenética; no obstante se debe tener en cuenta que la variante China 1 se caracteriza por poseer mutaciones sinónimas exclusivas como 209 (C>A) y 230(A>G) en su región C-Ter, los cuales, los aislados argentinos también presentaban, por lo que inicialmente los aislados se agruparon con China1, sin embargo al evaluar la región completa de la proteína, se encontraron mutaciones características de la línea celular Raji (His213Asn, Leu226His), lo que modificó el análisis filogenético y lo relacionó con esta última variante (Gantuz *et al.*,2017). Para el presente trabajo, y a diferencia de lo reportado en Argentina, no se reportó una relación con la variante China 1, pero si se encontraron mutaciones reportadas en relación con la región C-Ter de la línea celular Raji, lo que soporta que los aislados de Cali se relacionaran en gran número a esta variante patogénica.

Por otro lado, en cuanto a los aislados relacionados con las variantes geográficas del mediterráneo, los recientes estudios realizados por Mei Liao *et al.*(2018) han determinado una distribución global de estas variantes, ya que las encontraron presentes en aislados de países con geografías muy diferentes como Ghana,

Brazil, EEUU, Kenia, Argentina y Australia; además se reportaron como unas de las variantes más encontradas en pacientes aparentemente sanos alrededor del mundo y no se han relacionado directamente con patogenias (Smatti *et al.*, 2017). Esta es una variante de distribución global por lo que se puede explicar su presencia en los adolescentes de la ciudad de Cali.

Finalmente, un 13,7% de los aislados no se relacionó ni con las líneas celulares, ni con los aislados geográficos incluidos en el estudio; las mutaciones encontradas en este agrupamiento también se observaron en Raji y Mediterráneo, por lo que se podrían tratar de mutaciones sinónimas en los nucleótidos que no modifican los aminoácidos. Investigaciones adicionales serán necesarias para caracterizar esta posible variante y reconocer si podría ser patogénica o un aislado geográfico propio, presente en la ciudad. Hasta el momento los estudios de VEB en Colombia se han centrado principalmente en la relación del virus con el desarrollo de diferentes enfermedades. Carrascal *et al.* (2003) examinaron 178 casos de carcinoma gástrico en Cali, identificando la relación del virus con el carcinoma en un 13%; así mismo, Quijano *et al.* (2004) detectaron una relación del 56,7% entre el VEB y el linfoma de Hodgkin mediante el análisis de LMP1 y Mesa *et al.* (2015) encontraron una relación entre el VEB y pacientes pediátricos con trasplante hepático, determinando que el grado de inmunosupresión parece ser el principal factor para el control de la replicación del virus; sin embargo, en el país no se han realizado estudios que determinen las variantes del VEB en otras regiones, por lo que no es posible realizar comparaciones entre aislados regionales y el presente estudio.

Análisis de mutaciones

El alto grado de variabilidad del gen *BNLFI* (Feederle *et al.*, 2015) permite apoyar la presencia de mutaciones observadas en los aislamientos del estudio. Sin embargo, la razón de la existencia de este alto número de variaciones a lo largo de toda la proteína es un interrogante actual. Existen trabajos previos que describieron que algunas proteínas de latencia del VEB presentan un mayor grado de variabilidad, lo cual pone en evidencia una tasa de evolución acelerada, quizás en respuesta al sistema inmune del hospedador (Santpere *et al.* 2014).

En los aislados de la región C-ter, se encontró en un 86,6% la presencia de la mutación no relacionada con patogenia Gly212Ser; este cambio ha sido reportado indicando su alta frecuencia en varias partes del mundo (Nagamine *et al.*, 2007, Zuercher *et al.*, 2012); a excepción de Rusia, donde hasta el momento no se ha observado esta mutación (Senyuta *et al.*, 2014) y en cambio han reportado la sustitución Glu328Gln para pacientes afectados y sanos en un gran porcentaje, que no es típica de las muestras de LMP1 en otras regiones (Yakovleva *et al.*, 2015, Pavlish *et al.*, 2008). En nuestro análisis no se encontró la mutación Glu328Gln, por lo que se valida que hay mutaciones del gen que codifica LMP1, únicas para algunas regiones del mundo, siendo esto un indicador de variabilidad.

Análisis con el servidor SIFT y Modelamiento con I-Mutant

De acuerdo con la clasificación propuesta por Ng y Henikoff (2003) las sustituciones en cada posición con valores de tolerancia menores a 0.05 se asumen que afectan negativamente la función de la proteína y aquellas con valores mayores o iguales a 0.05 se asumen que serán toleradas y no la afectarán; esta predicción in-silico, sugiere que en general todas las mutaciones que se presenten en la región C-Ter, afectarán la función proteica. Sin embargo, será necesario realizar más investigación al respecto.

De otro lado, la energía de Gibbs (G) se refiere a la espontaneidad de un proceso o capacidad potencial para que un proceso o reacción suceda, como la interacción entre proteínas (Sosa-Peinado, 2014). Por lo tanto, un sistema es inestable si la energía de Gibbs es elevada, lo cual indica que cuando la energía libre de Gibbs es mayor en una proteína con mutaciones, esta disminuye su estabilidad. Las mutaciones relacionadas con las variantes del Mediterráneo y Cali, en su mayoría se reportaron reduciendo la estabilidad de la proteína LMP1. Contrario a lo anterior, en todas las mutaciones exclusivas de la variante patogénica Raji, se reportó un aumento en su estabilidad. Este aumento o disminución de estabilidad proteica predicho por el Software I-Mutant probablemente estaría relacionados con la mediación de señales de LMP1 a través de receptores, sin embargo es necesario confirmar lo anterior con estudios posteriores realizados en análisis no in silico.

En conclusión, nuestros resultados destacan el alcance de la diversidad del VEB, particularmente en la proteína LMP1. Se determinó que en la ciudad de Cali – Colombia circula el subtipo VEB-1 y las variantes patogénica y geográfica, Raji y Mediterráneo respectivamente; además se encontró la circulación de una variante que no agrupa con ninguno de los aislados reconocidos hasta el momento. Al no existir otro estudio de variantes en el país se dificulta hacer un análisis con agrupamientos propios de la región, por lo que, sin duda, será necesario realizar más estudios para determinar si las muestras no agrupadas con ninguna variante reconocida se tratan de una variante geográfica o una variante patogénica que pueda llegar a afectar a los adolescentes de la ciudad.

Este trabajo contribuye a la ampliación del conocimiento actual sobre las variantes patogénicas y

geográficas, siendo el primer estudio de variantes de VEB en Colombia, realizado en individuos aparentemente sanos y usando técnicas moleculares.

AGRADECIMIENTOS

A Julio Cesar Osorio por su gran ayuda en el proceso de aprendizaje de las técnicas de laboratorio. Al Registro Poblacional de Cáncer, liderado por el Dr. Luis Eduardo Bravo por facilitar las muestras, el laboratorio y el personal de apoyo. A Mayra Erazo, María Alejandra Álzate y María Alejandra Vargas por la ayuda prestada durante la elaboración de este trabajo. A mi familia, en especial a mi bisabuela Maria Lilia Terranova por ser ese gran apoyo e inspiración y a mis amigos por la paciencia y apoyo incondicional en cada paso de mi vida.

REFERENCIAS

- Ai, J., Xie, Z., Liu, C., Huang, Z. and Xu, J. (2012). "Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children", *Virology journal*, Vol. 9 No 13.
- Brady, G., MacArthur, G. and Farrell, P. (2008). "Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma". *Postgraduate Medical Journal*, Vol. 84 No.993, pp.372-377.
- Carrascal, E., Koriyama, C., Akiba, S., Tamayo, O., Itoh, T., Eizuru, Y., Garcia, F., Sera, M., Carrasquilla, G., Piazuolo, MB., Florez, L. and Bravo JC. (2003), "Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Cali, Colombia", *Oncol Rep*, Vol.10 No.4, pp.1059-62.
- Chabay, P., De Matteo, E., Merediz, A. and Preciado, M. (2004). "High frequency of Epstein Barr virus latent membrane protein-1 30 bp deletion in a series of pediatric malignancies in Argentina." *Arch Virol*, Vol.149 No. 8, pp. 1515-1526.
- Chabay, P and Preciado MV. (2016). "Epidemiology of Epstein-Barr virus-associated pediatric lymphomas from Argentina" . *Boletín médico del hospital infantil de México*. Vol.73 No.1, pp. 47-54.
- Chang, C., Yu, K., Mbulaiteye, S., Hildesheim A. and Bhatia, K (2009). "The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal." *Virus Res*, Vol.143 No.2, pp. 209-221.
- Chiara, M., Manzari, C., Lionetti, C., Mechelli, R., Anastasiadou, E., Chiara M. et al. (2016). "Geographic Population Structure in Epstein-Barr Virus Revealed by Comparative Genomics. *Genome Biol Evol*. Vol 8, pp.3284.3291
- Coleman, C., Daud, I., Ogolla, S., Ritchie, J., Smith, N., Sumba, P., Dent, A. and Rochford, R. (2017). "Epstein-Barr Virus Type 2 Infects T Cells in Healthy Kenyan Children". *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 216 No.6, pp. 670-677.
- Correa, R., Fellner, M., Alonio, L., Durand, K., Teyssie, A. and Picconi, M. (2004). "Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene". *J Med Virol*, Vol.73 No.4, pp.583-588.
- Dawson, C., Port, R. and Young, L. (2012). "The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC)". *Seminars in Cancer Biology*, Vol. 22 No. 2, pp. 144-153.
- Dolan, A., Addison, C., Gatherer, D., Davison, A., and McGeoch, D (2006). "The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876." *Virology*, Vol. 350 No. 1, pp. 164-170.
- Edwards, R. H., Seillier-Moiseiwitsch, F. and Raab-Traub, N. (1999). "Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains". *Virology*, Vol. 261 No. 1, pp. 79-95.
- Epstein, M., Achong, B. and Barr, Y. (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma". *The Lancet*, Vol. 283 No.7335, pp.702-703.
- Farrell, P (2015). "Epstein-Barr Virus Strain Variation". *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol.390. pp.45-49
- Feederle, R., Klinke, O., Kutikhin, A., Poirey, R., Tsai, M. and Delecluse, H. (2015). "Epstein-Barr Virus: From the detection of sequence polymorphisms to the recognition of viral types". *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol 390, pp.119-48.
- Gallart-Catalá A. (2006). "Infecciones por el virus de Epstein-Barr: mononucleosis infecciosa". En: Cruz M, ed. *Tratado de Pediatría*. 9ª edición. Madrid: Ergon. pp, 449-55.
- Gantuz, M. (2016). "Identificación y caracterización molecular y funcional de variantes de la Proteína Latente de Membrana 1 del virus de Epstein Barr". Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de

Buenos Aires, Disponible en https://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_6055_Gantuz (Accesado 20 de septiembre 2018).

- Gantuz, M., Lorenzetti M.A., Chabay P,A.and Preciado, M. (2017). "A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association", *PLoS One*, Vol.10 No.4, pp.1059-62.
- Giraldo-Ocampo, S., Osorio, JC., Fernández, A., Castillo, A. (2019). "Detección del virus Epstein Barr en escolares adolescentes en la ciudad de Cali, Colombia" . *Infectio*. Vol. 23 No.2. pp, 175-181.
- Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Belnap, D. M., Baumeister, W. and Steven, A. (2003). "Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography". *Science* , Vol. 302 No.5649, pp.1396-1398.
- Hatfull, G., Bankier, AT., Barrell, BG. and Farrell, PJ. (1988) "Sequence analysis of Raji Epstein-Barr virus DNA". *Virology*. Vol.164 No.2. pp, 334-40
- Higgins, CD., Swerdlow , AJ., Macsween, KF., Harrison ,N., Williamns H *et al.* (2007). "A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes". *J Infect Dis* .Vol. 195, pp. 474 – 482.
- Izumi, K., Kaye, K. and Kieff, E. (1997). "The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 94 No.4, pp.1447-1452.
- Kapranos, N., Petrakou, E., Anastasiadou, C. and Kotronias, D. (2003). "Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic". *Fertility and Sterility*, Vol 79, pp.1566-1570
- Karpova, M.,Schoumans, J., Blennow, E., Ernberg, I., Henter,J., Smirnov A. et al. (2006). "Combined spectral karyotyping , comparative genomic hybridization , and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B Cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines.*Journal of Oncology*. Vol, 26,pp,605-617
- Kieser, A and Sterz, KR. (2015). "The Latent Membrane Protein 1 (LMP1). *Curr Top Microbiol Immunol*". Vol 391. Pp,119-149.
- Kingman, DW., Weiss, WB., Jaffe, ES., Kumar, S., Frekko, K.and Raffeld, M. (1996). "Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: Correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas" . *Blood*. Vol. 88 pp,242–251.
- Kumar,S., Stecher, G. and Tamura,K. (2016). "Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0". *Molecular Biology and Evolution*, Vol 33,pp.1870-1874
- Lee, DY. & Sugden, B.(2008). " The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis" . *Blood*. Vol.111 No.4. pp, 2280-2289.
- Lei, H., Li, T., Hung, G., Li, B., Tsai, S.and Lo, S. (2013). "Identification and characterization of EBV genomes in spontaneously immortalized human peripheral blood B lymphocytes by NGS technology" . *BMC Genomics*. Vol.14. pp, 804
- Lorenzetti, M. A., Gantuz, M., Altcheh, J., De Matteo, E., Chabay, P and Preciado,M. (2012). "Distinctive Epstein-Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: LMP1 sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms." *J Clin Microbiol*, Vol. 50 No.3, pp. 609-618.

- Mei Liao, H., Liu, H., Lei, H., Li, H., Li, B., Chin P, *et al.* (2018). "Frequency of EBV LMP-1 Promoter and Coding Variations in Burkitt Lymphoma Samples in Africa and South America and Peripheral Blood in Uganda", *Cancers* (Basel), Vol. 10 No.6, pp 177.
- Mesa, J. and Aristizábal, B. (2015). "Seguimiento con carga viral para virus Epstein-Barr en pacientes pediátricos con trasplante hepático". *Med UIS*. Vol 28, pp, 393-401
- Nagamine, M., Takahara, M., Kishibe, K., Nagato, T., Ishii H., Bandoh N *et al.* (2007). "Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/Tcell lymphoma. *Virus Genes*" Vol 34, pp. 47-54
- Ng, P., Henikoff, S. (2003). "SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function.. *Nucleic Acids Res.* Vol,31. Pp,3812-4
- Niedobitek, G., Meru, N. and Delecluse, H. (2008). "Epstein-Barr virus infection and human malignancies". *International Journal of Experimental Pathology*, Vol.82 No.3, pp.149-170.
- Palser, A., Grayson, N., White, R., Corton, C., Correia, S., Ba Abdullah, M., *et al* (2015). "Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumour Types and Normal Infection." *J Virol*. Vol. 89 No.10, pp. 5222-5237
- Pavlish O.A., Diduk S.V., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Goncharova E.V., Shalginskykh N.A. *et al.* (2008). "Mutations of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in Russian patients with lymphoid pathology and healthy individuals". *Vopr. Virusol.* Vol.53, pp. 10-16
- Pratt, Z., Zhang, J. and Sugden, B. (2012). "The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Oncogene of Epstein-Barr Virus Can Simultaneously Induce and Inhibit Apoptosis in B Cells". *Journal of Virology*, Vol.86 No.8, pp.4380-4393.
- Quijano, S., Saavedra, C., Fiorentino, S., Orozco, O. and Bravo, M. (2004). "Presencia del virus de Epstein-Barr en casos colombianos de linfoma de Hodgkin y su relación con la respuesta al tratamiento". *Biomédica*, Vol. 24 No. 2, pp.163-173.
- Rickinson, A and Kieff, E (2007). "Epstein Barr virus. Fields Virology". P. M. H. D M Knipe. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. Vol.2, pp. 2655-2700.
- Rubsamen-Waigmann, H., Deres, K., Hwelett, G. and Welker, R. (2003) "Viral Infections and Treatment". Ed. Marcel Dekker., New York. Vol 23. Pp,625-628
- Saechan, V., Settheetham-Ishida, W., Kimura, R., Tiwawech, D., Mitarnun, W and Ishida T. (2010). Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J Gen Virol*. Vol.9, pp.2054-61.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A and Kieff, E. (1990). "Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes". *J. Virol*. Vol.64, pp. 4084-4092.
- Santpere, G., Darre, F., Blanco, S., Alcamí, A., Villoslada, P., Mar, M. and Navarro, A (2014). "Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project." *Genome Biol Evol*. Vol. 6 No.4, pp. 846-860.
- Sandvej, K., Gratama, J.W., Munch, M., Zhou, X.G., Bolhuis, R.L., Andresen, B.S., Gregersen, N. and Hamilton-Dutoit S. (1997). "Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates". *Blood*. Vol 90, pp.323-330.

- Senyuta, N., Yakovleva, L., Goncharova, E., Scherback, L., Diduk, S., Smirnova, K., Maksimovich, D and Gurtsevitch V. (2014). "Epstein-barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia". *J Med Virol.* Vol. 86 No.2, pp 290-300.
- Smatti, M., Yassine, H., AbuOdeh, R., AlMarawani, A., Taleb, S., Althani, A. *et al.* (2017). "Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar" *PLoS ONE*, Vol.12 No.12
- Sosa-Peinado, A. (2014), "Interacciones entre ligandos y las proteínas: fundamentos, detección y futuro del rediseño de interacciones", *Mensaje Bioquímico*, Vol. 41, pp. 103-126.
- Tsao, SW., Tramoutanis, G., Dawson, CW., Lo, AK. And Huang, DP. (2002). "The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma". *Semin Cancer Biol.* Vol.12 No 6. Pp,473-487
- Tsao, SW., Tsang, CM. and Lo, KW. (2017). "Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Vol. 19, 372
- Tzellos, S. and Farrell, P. (2012). "Epstein-Barr Virus Sequence Variation" *Biology and Disease. Pathogens*. Vol.1 No.2 pp, 156-174.
- Vaysberg, MO., Hatton, SL., Lambert, AL., Snow, B., Wong SM *et al.* (2008). "Tumor-derived variants of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos". *J Biol Chem.* Vol.283. No.52. pp,36573-36585.
- Walling, DM., Shebib, N., Weaver, SC., Nichols, CM., Flaitz, CM. and Webster-Cyriaque, J. (1999). "The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene" *J. Infect. Dis.* Vol. 179 pp,763-774.
- Yakovleva, L., Senyuta, N., Goncharova, E., Scherback, L., Smirnova, R., Pavlish, O and Gurtsevitch, V. (2015). "Epstein-Barr Virus LMP1 Oncogene Variants in Cell Lines Of Different Origin. *Molecular Biology*. Vol.49 No.5, pp.714-722.
- Young, L. and Murray, P. (2003). "Epstein -Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours". *Oncogene*, Vol.22 No.33, pp.5108-5121
- Young LS, Rickinson AB. (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on". *Nat. Rev. Cancer*. Vol.4 pp,757-768
- Zuercher, E., Buttica, C., Wyniger, J., Martinez, R., Battagay, M and Boffi El Amari, E. (2012) "Genetic Diversity of EBV-Encoded LMP1 in the Swiss HIV Cohort Study and Implication for NF-Kb Activation. *PloS One*. Vol. 7 No.2: e32168.
- Zuo, L., Yu, H., Liu, L., Tang, Y., and Wu H *et al.* (2015). "The copy number of Epstein-Barr virus latent genome correlates with the oncogenicity by the activation level of LMP1 and NF-kB". *Oncotarget*. Vol.6 No.38. pp, :41033-41044